ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ВЕТЕРИНАРИИ

УДК: 581.69-636.03

Г.Т. Акиншина, А.Г.Алимов, А.М.Шилов
(ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко (ВИЭВ) РАСХН, Институт паразитологии РАН)

ВОЗБУДИТЕЛЬ ТОКСОПЛАЗМОЗА (TOXOPLASMA GONDII): ЛЕКАРСТВЕННАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ И ВИРУЛЕНТНОСТЬ ВОЗБУДИТЕЛЯ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ИНФЕКЦИИ В КЛЕТОЧНЫХ СИСТЕМАХ И НА МЫШАХ

В настоящее время очень актуальными являются исследования по выяснению причин и факторов, способствующих развитию устойчивости паразитических простейших (малярийных паразитов, трипаносом, токсоплазм и др) к специфическим лекарственным препаратам. Токсоплазмы в этом отношении представляют наиболее благоприятную модель, ибо легко культивируются во всех известных до сих пор типах клеток и тканей. Использование клеточных культур, инфицированных токсоплазмами, открывает широкие возможности для скрининга лекарственных препаратов и разработки метов химиотерапии при токсоплазмозе и других протозойных заболеваниях. В первую очередь, такая система оказывается необходимой для скрининг-испытаний различных лекарственных соединений против различных стадий развития этого паразита (McCleod, Remington, 1981; Derouin, Chastang, 1990; Derouin et al., 1992; Araujo et al., 1991;Roman et al.,1993; Reynolds et al.,2002;). Однако эти исследования могут быть углублены и расширены при использовании штаммов разной вирулентности, изолированных от животных и человека, что позволяет исследовать связь вирулентности токсоплазм со способностью выработки ими устойчивости к специфическим лечебным препаратам, а, следовательно, внести большой вклад в химиотерапию острых и хронических форм токсоплазмоза.

Введение в систему паразит-клетка в культуре клеток специфического лечебного препарата, в частности дараприма, обеспечивает возможность подавления отдельных звеньев метаболизма паразита с целью выяснения не известных до сих пор причин облигатного внутриклеточного существования возбудителя токсоплазмоза. Предполагалось опосредованное действие дараприма через клетку-хозяина, причем минимально эффективные дозы, необходимые для подавления размножения паразита определялись в большой степени лишь происхождением клеток-хозяев (Doran, 1973; Sheffield, Melton,1975; Grossman, Remington,1979; Israelski et al., 1989;). Однако отмечались вариации в ингибирующем эффекте дараприма, определявшегося по отсутствию ЦПД в культурах клеток и выживанию мышей, что возможно было связано с различиями в количестве токсоплазм, выживших при различных концентрациях препарата. Не было получено доказательства, что персистирующие эндозоиты из таких культур устойчивы к дараприму.

Хотя в настоящее время наиболее эффективным препаратом для лечения острого токсоплазмоза продолжает оставаться дараприм (отечественный хлоридин), однако он влияет лишь на активно размножа-

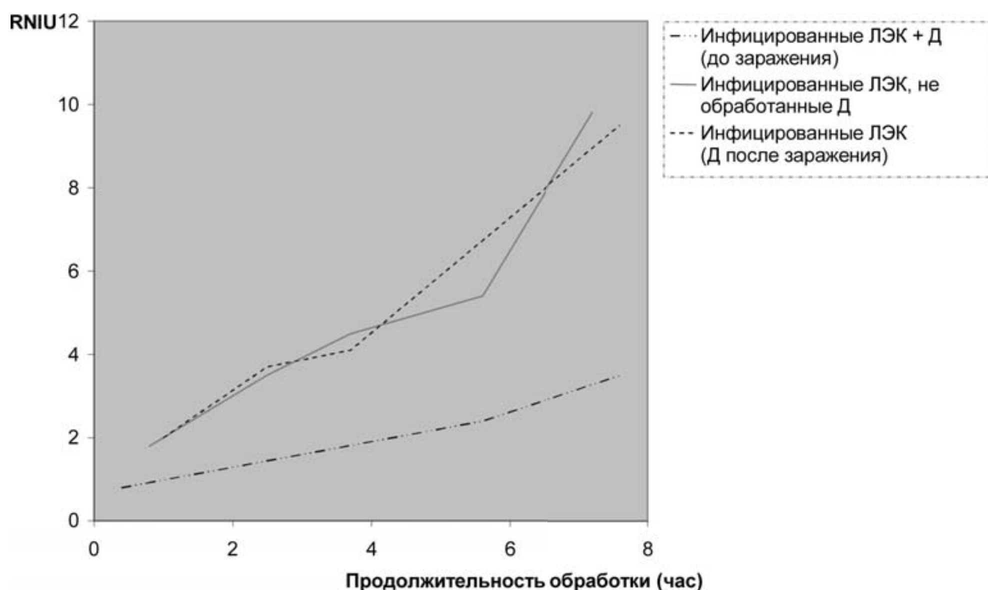


Рисунок 1. Динамика размножения токсоплазм в инфицированных культурах ЛЭК, обработанных дарапримом (12мкг/мл) в течение 5 часов до и после заражения

ющиеся эндозоиты и не действует на цисты токсоплазм. Отсутствуют также данные по развитию резистентности к дараприму у токсоплазм, их изменчивости в этих условиях и связи этого процесса с вирулентностью штаммов, особенно свежеизолированных от животных и человека.

Учитывая эти нерешенные вопросы, нами были проведены сравнительные исследования на моделях старого лабораторного сильновирулентного штамма RH и и некоторых свежеизолированных от животных и человека штаммах с использованием разработанного нами ранее метода клонирования токсоплазм (Акиншина, Засухина, 1966). Были поставлены для разрешения следующие задачи:

1. Определение действия дараприма на проникновение и размножение токсоплазм штаммов разной вирулентности в системе клеточных культур легкого эмбриона коровы(ЛЭК).

2. Выработка резистентности токсоплазм вирулентного штамма к дараприму.

3. Резистентность к дараприму и вирулентность токсоплазм разных штаммов.

Материалы и методы.

Постановка экспериментов

Перевиваемые культуры ЛЭК были выращены в специальных пробирках на покровных стеклах и заражались токсоплазмами штаммов RH, МА, АЖ-4 по методам, описанным нами ранее (Акиншина,2000, 2002).

Исходный раствор дараприма(1000мкг/мл) готовился путем постепенного растворения 100мг дараприма в 2мл молочной кислоты и добавления 98мл основной питательной среды MEM. В экспериментах исследовалась целая серия разведений, начиная от 0,25мкг/мл и до 180мкг/мл.

Поставлено 3 серии экспериментов.

I. Дараприм в испытуемой концентрации вводился: а) одновременно с токсоплазмами; б) за 5 часов до инфицирования клеточных культур токсоплазмами; в) через 5 часов после инфицирования клеточных культур. Время регистрации размножения токсоплазм во всех случаях – 21 час.

II. Получение лекарственноустойчивых клонов токсоплазм. Первоначально в опытах изучалось действие дараприма на внутриклеточные и внеклеточные токсоплазмы штамма RH, культивируемые в культурах ЛЭК. Опыты проводились путем постоянного добавления дараприма в увеличивающихся концентрациях (от 0,3мкг/мл до 160мкг/мл) в питательную среду культуры клеток ЛЭК, зараженной токсоплазмами, в процессе 6-11 пассажей. На каждом пассаже (при 75% дегенерации клеток) клетки снимали со стенки флакона и суспензию их (0,2 мл) вводили в свежие культуры с постоянным добавлением дараприма и без такового. В последующих опытах процедура была несколько видоизменена. Инфицированные и обработанные дарапримом клетки снимали и суспензию их вводили интраперитонеально мышам Swiss , а 3-4 дня спустя у мышей был взят экссудат, которым заражали

подготовленные свежие культуры клеток ЛЭК, предварительно обработанные или необработанные дарапримом. Эта процедура повторялась 12 раз. Доза дараприма также постепенно увеличивалась до 180мкг/мл. Чистые клоны токсоплазм выделяли по модифицированному нами методу бляшек (Акиншина и др., 2007).

Каждый пассаж, как и выделение клонов, сопровождался параллельным заражением мышей Swiss, как известно, погибающих даже от единичных эндозоитов вирулентного штамма RH. Для контроля стабильности свойства резистентности бляшки резистентных клонов, полученных под агаром и покрытием с дарапримом, были выделены и накоплены в культуре ЛЭК без добавления дараприма. В качестве критериев оценки резистентности к дараприму, стабильности этого свойства и вирулентности резистентных клонов служили следующие параметры: время выживания мышей и ритм размножения токсоплазм в культуре клеток ЛЭК.

III серия экспериментов: культуры клеток инкубировали с дарапримом в течение разного времени (до 24 часов) до заражения их токсоплазмами. Концентрация лекарства: 12 мкг/мл. Продолжительность размножения токсоплазм – 14 часов Контролями служили незараженные культуры ЛЭК, зараженные культуры ЛЭК, культуры клеток ЛЭК, обработанные дарапримом и не инфицированные, культры ЛЭК, обработанные соответствующим раствором молочной кислоты.

Все клеточные культуры фиксировали в смеси Никифорова и окрашивали по Романовскому-Гимза в нашей модификации (Акиншина,1983).

Действие дараприма оценивалось при сравнении обработанных инфицированных культур с соответствующими контролями по следующим критериям: 1/степень инвазионности – относительное количество инфекцинных единиц (RNIU; Lycke, Lund, 1964); 2/степень ингибирования размножения – по среднему количеству паразитов на клетку или общему количеству паразитов на 100 клеток.

Результаты и обсуждение

Сравнительное изучение контрольных, необработанных дарапримом и инфицированных токсоплазмами вирулентного штамма RH культур клеток ЛЭК и обработанных дарапримом (доза 3мкг/мл до 12мкг/мл) выявило значительные различия в морфологии внутриклеточных паразитов и их количестве в клетках-хозяевах.

Токсоплазмы принимали более округлую форму, увеличивались в размерах, часто теряли тинкториальные свойства, содежали большое количество вакуолей и плотных гранул в цитоплазме. Если первое деление паразитов могло проходить нормально, то затем наблюдалась остановка деления или атипичное деление. В результате постоянных обработок дарапримом процесс дальнейшего размножения токсоплазм в клетках останавливался, обнаруживались многочисленные двуядерные формы паразитов или паразиты в начальной стадии деления, Картины эндополигении не были обнаружены. На более поздних сроках развития (15-17 суток после заражения), наряду со значительной элиминацией паразитов отмечалось формирование отдельных цистоподобных скоплений иногда в виде одиночных или парных паразитов в отдельных вакуолях клетки, постепенно приводящее к формированию цист.

Обнаружено, что одновременное введение дараприма вместе с токсоплазмами в питательную среду культивируемых клеток не оказывает влияния на способность токсоплазм проникать в клетки и их дальнейшее размножение в культурах клеток. Однако предварительная обработка дарапримом инфицированных культур клеток ингибирует пролифераивную активность паразитов по сравнению с необработанными культурами или культурами, обработанными лекарством после заражения клеток токсоплазмами (рис.1).

Таким образом, тормозящее влияние дараприма на размножение токсоплазм отмечалось лишь в случае введения препарата до заражения. Дараприм, концентрирующийся в клетке-хозяине и угнетающий размножение токсоплазм, тем не менее не предотвращает пенетрации токсоплазм в клетки. В то же время действие препарата на внутриклеточные размножающиеся формы снижало их последующую инвазионную способность при внедрении в другие клетки.

Полученный эффект ингибиции развития токсоплазм вирулентного штамма RH под влиянием дараприма, введенного до заражения, был проверен при сравнительном изучении других штаммов, отличающихся по вирулентности, в частности, свежеизолированных нами штаммов МА и АЖ-4 (табл.1)

Сравнение сильновирулентного штамма RH и маловирулентных штаммов МА и АЖ-4 показало, что наиболее медленно размножающиеся эндозоиты штаммов МА и АЖ-4 оказались более устойчивы к

Таблица 1

Сравнение инфективности токсоплазм разных штаммов в процессе выработки резистентности к дараприму (Д)

Доза Д (мкг/мл)	RH			MA			АЖ-4		
	Оп - 1	Оп -2	Средн. в%	Оп - 1	Оп -2	Средн. в%	Оп - 1	Оп -2	Средн. в%
К	0/15	0/15	0	7/15	9/15	53,3	13/15	15/15	93,3
12	15/15	15/1	100	8/15	7/15	50,0	14/15	9/10	92,0
24	14/15	15/15	96,6	8/12	8/15	59,2	12/15	10/10	88,0
48	15/15	13/13	100	8/12	10/15	66,6	13/15	10/10	92,0

К- инфицированные культуры, не обработанные дарапримом
Числитель – количество выживших мышей (не менее 21 сут.)
Знаменатель – общее число инфицированных мышей

дараприму по сравнению с RH. Все использованные дозы были летальны для токсоплазм штамма RH. Контрольное заражение мышей Swiss обработанными дарапримом культурами и инфицированными токсоплазмами разных штаммов выявило следующие различия в количестве выживших мышей: RH-0%; MA – 53,3%; АЖ-4 – 93,3%.

Из данных таблицы 1 видно, что хотя штаммы MA и АЖ-4 отличались по количеству выживших после заражения мышей, еще более они отличались от штамма RH, вызывающего 100% гибель мышей при заражении необработанными и инфицированными клеточными культурами. Обработка культур дарапримом в дозировке 48 мкг/мл вызывала гибель, видимо, большинства токсоплазм штамма RH, что проявлялось в 100% выживании мышей, свободных от токсоплазм, но не вызывала гибели всех паразитов штамма MA, что проявлялось в большем% выживших после заражения мышей по сравнению с контролем (66% и 53% соответственно). С другой стороны, воздействие дараприма на токсоплазм изменяет также некоторые свойства популяции. В опытах с сильновирулентным штаммом RH обработка дарапримом инфицированных культур в описанном режиме приводила к понижению вирулентности популяции при подкожном пути заражения мышей; в опытах со свежеизолированным вирулентным штамом Д-1 – к понижению вирулентности при интраперитонеальном и

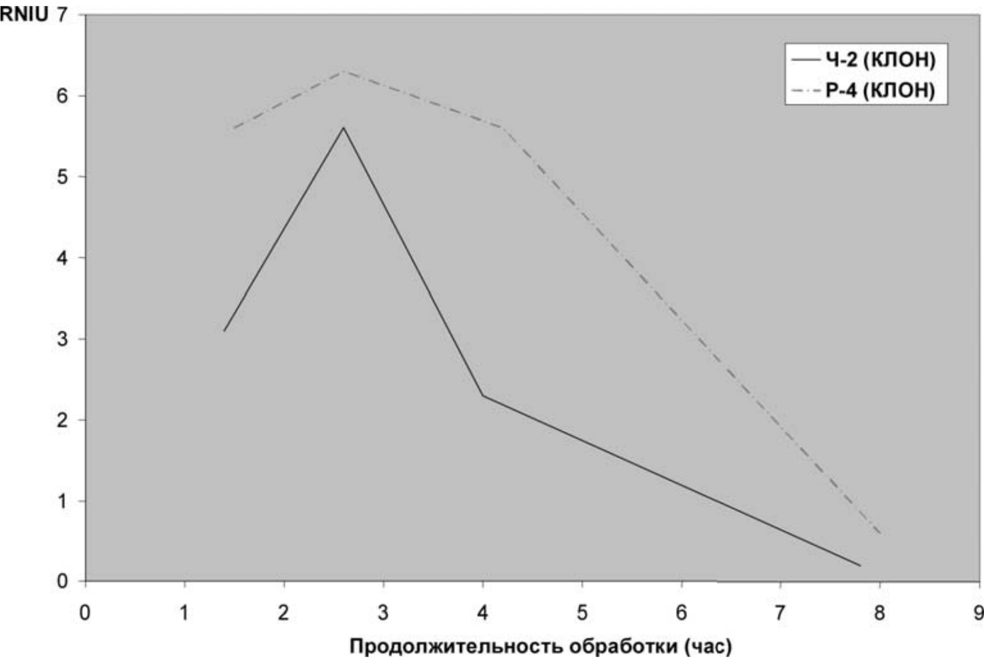


Рисунок 2. Действие продолжительности обработки клеток дарапримом на инвазионность и размножение токсоплазм (время размножения токсоплазм – 14 часов)

подкожном пути заражения по сравнению с исходными штамами.

Эти данные подтверждаются также экспериментами на модели клеточных культур ЛЭК. Первое деление паразита происходит без видимых изменений, в то время как последующие генерации токсоплазм испытывают влияние лекарства как на ритм размножения, так и на морфологические свойства.

Сравнение клонов сильновирулентного штамма RH и маловирулентного (МА) штаммов показало, что медленно размножающиеся токсоплазмы клонов, выделенных от маловирулентного штамма (Р-4), оказались более резистентными к лекарству, чем токсоплазмы сильновирулентного клона (Ч-2), отличающиеся высоким темпом деления и более ингибируемые дарапримом (рис. 2).

Изолирование бляшек – клонов токсоплазм в клеточной системе, выживших в результате действия дараприма, проводилось на 2-3 дня позже контрольных, т.е. время генерации особей удлинялось. Видимо, увеличение продолжительности одного поколения эндозоита происходит за счет интервала между делениями, а не самого процесса деления, о чем свидетельствует незначительное количество делящихся паразитов. Этот процесс приводит к уменьшению вирулентности устойчивых к дараприму клонов и постепенному формированию цистоподобных скоплений в инфицированных культурах. В световом микроскопе обнаруживаются наряду с гипертрофированными формами более мелкие, с очень компактным почти точечным ядром. Изучение резистентных клонов токсоплазм в условиях выработки резистентности во время последовательных пассажей на культурах клеок и на мышах показало, что контрольные опыты, без добавления дараприма, где речь идет о поколении резистентных токсоплазм, выживших после очередной обработки, отличаются по темпу размножения от постоянно обрабатываемых культур, но не по включению Н3-тимидина. Видимо, резистентные токсоплазмы продолжают измененный синтез ДНК даже в отсутствии дараприма (не опубликованные данные).

Заключение

Изучение специфического антитоксоплазменного действия дараприма в системе инфицированных клеточных культур и на модели мышей Swiss выявило определенную градацию между чувствительностью и резистентностью токсоплазм к препарату, коррелирующую с вирулентностью штаммов и клонов, что позволило разработать различные модели персистенции токсоплазм в клеточных системах, соответственно проявлениям и последствиям взаимодействия паразита и клетки-хозяина:

1. чувствительность к дараприму характеризуется полным очищением инфицированных клеточных культур от токсоплазм без последующих рецидивов;

2. устойчивость к дараприму (доза 48 мкг/мл) приводит к формированию 3 типов персистенции: медленная, хроническая и латентная:

«медленная» инфекция характеризуется остановкой деления токсоплазм в первые 7-10 часов, незначительными дегенеративными изменениями клеток-хозяев с последующим рецидивом пролиферативной активности токсоплазм через 3-4 суток, заканчивающимися тяжелым поражением клеток;

хроническая инфекция, сопровождающаяся редкими очагами с делящимися паразитами, постепенно замедляющими темп размножения и образующими цистоподобные скопления из «агглютинирующихся» эндозоитов в отдельных клетках, что приводит к значительному «очищению» монослоя клеток. Однако сохранение отдельных очагов «дремлющих» внутриклеточных форм может привести к реактивации процесса;

латентная инфекция – персистенция паразитов без выраженного ЦПД в клеточной популяции, коротким циклом постепенно замедляющегося размножения возбудителя, приводящего к формированию форм его латенции – цист.

Разработанные модели могут быть использованы для скрининга новых лекарственных препаратов, градации чувствительности и резистентности паразитов, а также для биотехнологии –в частности, получения высокоспецифичных культуральных вакцин и антигенов для профилактики и диагностики токсоплазмоза и других кокцидиозов.

SUMMARY

Pyrimethamine resistance production in embryonal lung Bos taurus cell culture (LEK) interfered with endodyogenie and resulted in the formation of multinucleated endozoite stages. Our virulence in vitro and in vivo assay suggest that as drug resistance increased the virulence in mice and cell system decreased.

Some gradation between Toxoplasma sensibility and resistance permitted us to elaborate different models of Toxoplasma persistence: "slow», chronic and latent infection.

Литература

1. Акиншина Г.Т., Засухина Г.Д. Метод исследования мутаций Toxoplasma gondii. Ж. Генетика, 1966, с. 72-75.
2. Акиншина Г.Т. Система паразит-клетка (хозяин): морфофункциональный анализ и моделирование развития возбудителя токсоплазмоза и некоторых других внутриклеточных паразитических простейших. Автореф. докт.дисс.1983.
3. Акиншина Г.Т., Алимов А.Г., Гальнбек Т.В. Цитоэкологические механизмы реализации потенциала патогенности облигатного внутриклеточного паразита Toxoplasma gondii(Sporozoa) при моделировании in vitro в клеточных системах. // «Теоретические и прикладные аспекты паразитологии». М: Наука, 2002. С.6-15.
4. Акиншина Г.Т., Алимов А.Г., Гальнбек Т.В. Персистенция облигатного внутриклеточного паразита в клеточных системах: цитоэкологические механизмы взаимотрансформаций штаммов разной вирулентности // « Успехи общей паразитологии». М.: Наука, 2004. С. 45-52.
5. Araujo F., Huskinson J., Remington J. Remarkable in vitro and in vivo activities of the hydroxynaphthoquinone 566c80 against tachyzoites and tissue cysts of Toxoplasma gondii. Antimicrob. Agents Chemother., 1991, 35, p. 293-299.
6. Derouin F., Chastang C. In vitro effects of folate inhibitors jn Toxoplasma gondii. Antimicrob. Agents and Chemother. 1989, p. 1753-1759.
7. Derouin F., Almadany R., Chau F. et al. Synergistic activity of azithromycin and pyrimethamine or sulfadiazine in acute experimental toxoplasmosis. Antimicrob. Agents and Chemother., 1992, p. 997-1001.
8. Grossman P., Remington J. The effect of trimethoprim and sulfamethoxazole on Toxoplasma gondii in vitro and in vivo. Am.J.Trop. Med. Hyg., 1979, 28, 445-455.
9. Israelski D., Tom C., Remington J. Zidovudine antagonizes the action of pyrimethamine in experimental infection with Toxoplasma gondii. Antimicrob. Agents and Chemother., 1989, p. 30-34.
10. Lindsay D., Reppey N., Blagburn B. Ultrastructural effects of diclazuril against Toxoplasma gondii and investigation of a diclazuril-resistant mutant. J. Parasitol., 1995, p. 459-466.
11. Reynolds M., Oh J., Roos D. In vitro generation of novel pyrimethamine resistance mutations the Toxoplasma gondii dihydrofolate reductase. Antimicrob. Agents Chemother., 2001, 45, 4, p.1271-1277.
12. Sheffield H., Melton M. Effect of pyrimethamine and sulfadiazine on the fine structure and multiplication of Toxoplasma gondii in cell cultures. J. Parasitol. 1975, 61, p. 704-712.

УДК: 619:616:089.07

В.В. Горохов, Р. А. Пешков, Е.В. Горохова
(Всероссийский институт гельминтологии им. К.И. Скрябина)

ТОКСОКАРОЗ КАК ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ПРОБЛЕМА

Токсокароз в современных условиях приобретает совершенно иное значение – становится серьезной экологической проблемой. Только по вине человека каждая вторая проба почвы с детских площадок в мегаполисе Москвы инвазирована яйцами токсокар от собак или кошек, что создает опасность и высокую степень риска для и для взрослых.

Возбудители токсокароза относятся к семейству Anisakidae , роду Toxocara. Известными представителями данного рода являются: T. canis- гельминты главным образом семейства Canidae , T. mistax- семейства Felidae, T. vitulorum- буйволов и коров, T. leonaria- львов.

Из данных видов наибольший интерес представляет T. canis, которая вызывает одно из опаснейших заболеваний плотоядных и человека. Заболевание вызывается миграцией личинок токсокар, характеризуется длительным рецидивирующим течением и полиорганным поражением иммунологической природы.

Пораженность плотоядных T. canis во всех странах мира достаточно высокая. Например, в Москве она составляет практически 50%. При этом наиболее восприимчивыми остаются молодые особи благодаря существованию пренатального и трансмаммарного механизма передачи инвазии.

По результатам гельминтологического вскрытия трупов собак на утильзаводе «Эколог» до 24% особей были инвазированы гельминтами, и ведущее место среди них занимает инвазия T. canis.

Половозрелые особи данного гельминта крупные раздельнополые нематоды - самцы длинной 5-10 см, хвостовой конец изогнут, на нем находятся две одинаковые спикулы. Длина самки: 10-18 см. На головном конце есть кутикулярные крылья. Между пищеводом и кишечником имеется желудочек- характерный признак этого вида. Средняя продолжительность жизни половозрелых особей 4-6 месяцев. Яйца размером 0,068-0,075 мм, огруглые. темновато-серые, с хорошо выраженной ячеистостью.

Вышедшие с фекалиями яйца, дозревая во внешней среде, становясь инвазионными, попадают из почвы в рот, затем в желудок и тонкую кишку хозяина. В тонкой кишке из яиц вылупливаются личинки, ко-